

Bestimmung von Kephalin, Lecithin, Lysolecithin und Sphingomyelin im Serum oder in anderen biologischen Flüssigkeiten

VON P. ZÄHLER

Aus dem Theodor-Kocher-Institut der Universität Bern (Wissenschaftliche Leitung: Prof. E. F. Lüscher) und dem Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes (Direktor: Prof. A. Hässig)

(Eingegangen am 2. Dezember 1966)

Eine einfache Routine-Methode zur Bestimmung der 4 wichtigsten Serumphosphatide Lecithin, Lysolecithin, Kephalin und Sphingomyelin wird beschrieben. Die im Detail ausgeführte Vorschrift umfaßt die Lipoidextraktion aus dem Serum, die dünn-schichtchromatographische Auftrennung, die Elution der Lipoidfraktionen aus dem Kieselgel, sowie die Phosphorbestimmung. Die Methode erlaubt folgende quantitative Angaben: Gesamtlipide, Anteil Phosphatide, Anteil Lecithin, Lysolecithin, Kephalin und Sphingomyelin.

A simple routine method is described for determining the four main serum-phosphatides: Lecithin, lyso-lecithin, cephalin and sphingomyelin. The detailed specification covers the extraction of the lipids from the serum, the thin layer chromatographic separation, the elution of the lipid fractions from the silica gel and the determination of phosphorus. This method gives quantitative data on the following: Total lipids and the amounts of phosphatides, lecithin, lysolecithin, cephalin and sphingomyelin.

Durch die Einführung der Kieselsäure für die Chromatographie der Lipide durch KAUFMANN (1) im Jahre 1939 hat die gesamte Lipoidchemie einen bedeutenden Impuls erhalten, der sich allerdings erst in den Fünfzigerjahren auszuwirken begann. WREN (2) hat 1960 die Erfahrungen mit Kieselsäure in der Säulenchromatographie beschrieben und MARINETTI (3) hat die Resultate der in den USA verwendeten Chromatographie auf kiesel-säureimprägniertem Papier zusammengefaßt. Die ersten dünn-schichtchromatographischen Trennungen von Lipiden an Kieselsäure gehen auf WEICKER (4), MANGOLD (5) und WAGNER und Mitarbeiter (6) zurück; weitere Arbeiten auf diesem Gebiet haben dabei ergeben, daß für die quantitative chromatographische Bestimmung der Lipide die Dünnschicht gegenüber der Säule und dem Papier wesentliche Vorteile bietet. Eine Reihe von Autoren (4, 7–16) haben teils für qualitative Untersuchungen aber auch für quantitative dünn-schichtchromatographische Bestimmungen von Phosphatiden und Sphingolipiden Methoden ausgearbeitet. Die erhaltenen Ergebnisse lassen erkennen, daß der erzielte Trenneffekt bei geringerem Zeitaufwand gegenüber der Säule wesentlich besser ist. Die verschiedenen Methoden unterscheiden sich hauptsächlich in der Lipoidextraktion, der Aufarbeitung des Lipoidextraktes und der quantitativen Bestimmung der Lipoidfraktionen nach der chromatographischen Trennung, während die eigentlichen Chromatographie-Bedingungen nur geringfügig voneinander abweichen. Wir stellten uns deshalb die Aufgabe, die bisher nicht voll befriedigenden Teiloperationen — besonders die Lipoidextraktion und die quantitative Bestimmung der getrennten Lipide — näher zu untersuchen. Das Ziel war die Ausarbeitung einer möglichst einfachen, aber gut reproduzierbaren, speziell für die Lipoidanalyse im Serum geeigneten Routinetechnik.

Methodik

Es wird hier die ausführliche Beschreibung der Methode wiedergegeben, wie sie sich gestützt auf die Ergebnisse der nachfolgend beschriebenen Versuche als optimal erwiesen hat.

Lipoidextraktion (nach RENKONEN)

Das Serum oder Plasma soll möglichst frisch zur Analyse gelangen, da bei Lagerung auch bei +2° durch Hydrolyse der Lysophosphatidgehalt dauernd ansteigt. Wir verwendeten deshalb nur Proben, die höchstens 24 Stunden bei 2° oder aber bei –20° aufbewahrt worden waren.

In einem Reagenzglas mit Schliffstopfen gibt man 1,0 ml Serum oder Plasma zu 4,3 ml Chloroform-Methanol (5:8) (sämtliche Reagenzien und Lösungsmittel „pro analysi“). Ohne zu bewegen wird das Gemisch 8 Min. stehen gelassen. Dann wird während 30 Sek. stark geschüttelt und weitere 5 Min. stehen gelassen. Es werden dann 3,7 ml Chloroform und 1,0 ml H₂O zugegeben, zehnmal umgeschwenkt und 10 Min. stehen gelassen. Dann wird während 15 Min. bei etwa 1500 g zentrifugiert. Dabei trennt sich die wäßrige Phase von der Chloroformphase, wobei sich das denaturierte Serumprotein als feste Schicht an der Grenzfläche ansammelt. Mittels einer an Vakuum angeschlossenen Pipette wird die obere wäßrige Schicht vollständig abgesogen und die Proteinschicht mit einem Spatel etwas auf die Seite geschoben. Die Chloroformphase, welche theoretisch ein Volumen von 6,0 ml aufweist, wird sodann durch ein kleines Filter gegeben oder nach Abgießen erneut zentrifugiert. Für die weitere Verarbeitung steht in der Regel ein aliquotes klares Volumen von 3–5 ml zur Verfügung. Das aliquote Volumen (bei uns meist 4,0 ml) wird im Wasserbad bei 37° unter Einblasen von N₂ in einem tarierten Reagenzglas eingedampft, und der Rückstand über Nacht im Vakuumexsiccator über P₂O₅ getrocknet. Der Mittelwert des in der Dreifachbestimmung ermittelten Trockengewichtes auf 6,0 ml umgerechnet, ergibt den Gehalt von 1 ml Serum an Gesamtlipiden.

Bestimmung der Gesamt-Phosphatide

Das getrocknete Totallipoid wird im gleichen Röhrchen mit Chloroform unter leichtem Erwärmen gelöst, sodaß eine Lösung von etwa 10 mg Totallipoid/ml entsteht. Diese Lösung wird sowohl für die Phosphorbestimmung wie auch für die Chromatographie verwendet.

0,1 ml dieser Lösung werden auf 3,5 ml mit Chloroform verdünnt und je 0,5 ml dieser Lösung werden in 3 Pyrex-Reagenzgläser abpipettiert. Das Lösungsmittel wird auf kleiner Flamme abgedampft. Die Röhrchen sind damit für die P-Bestimmung bereit; sie enthalten je etwa 1,5 µg P.

Phosphor-Bestimmung (nach SHIN modifiziert)

Pro Röhrchen gibt man 0,75 ml H₂SO₄ 10N zu und erhitzt auf mittlerer Flamme bis alles Wasser abgetrieben ist. (Der Kondensationsring der H₂SO₄ muß bis zum oberen Rand des Reagenzglases gebracht werden.) Die Aufschlußlösung ist braun gefärbt. Nach Erkalten gibt man 1 Tropfen Perhydrol zu und erhitzt bis alles Wasser verdampft und die Lösung farblos geworden ist. Nach Erkalten 1 Tropfen Harnstoff 5-proz. zusetzen und wiederum er-

hitzen, bis alles Wasser ausgetrieben ist. Zur abgekühlten Probe gibt man 4,35 ml H_2O und 0,2 ml 5-proz. Ammonmolybdat- $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ und 0,2 ml Reagenz nach FISK-SUBBA-ROW (17) (6,85 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ werden in 50 ml H_2O bidest gelöst. 0,125 g Aminonaphtholsulfosäure zugeben und kräftig schütteln bis nur noch geringe Trübung bleibt. Tropfenweises Zufügen einer 30-proz. Na_2SO_3 -Lösung bis die Lösung völlig klar ist. Die Lösung ist im Dunkeln aufbewahrt höchstens 14 Tage haltbar). Die Röhrchen mit einem Totalvolumen von 5,0 ml werden während 7 Min. in ein siedendes Wasserbad gestellt und anschließend 5 Min. im Eisbad gekühlt. Die Extinktion wird innerhalb 20 Min. im Spektralphotometer bei 830 m μ gegen Wasser gemessen. Gleichzeitig werden 3 Reagenzienblindwerte und drei P-Standards (2 μg P) mitgeführt (Stammlösung: 6,74 g $\text{Na NH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ p. a., Fa. Merck in 1000 ml H_2O bidest; P-Standard: Verdünnung 1 : 500 = 2 μg P/ml).

Berechnung

Die Mittelwerte der Extinktionen werden in der Eichkurve auf μg P umgerechnet und müssen mit 7 und 25 multipliziert werden (durchschnittlicher P-Gehalt der Phosphatide etwa 4%). Man erhält sodann das Gewicht der Phosphatide in 1 mg Totallipoid.

Quantitative Dünnschichtchromatographie

Vorbereitung der Schichten

25 g Kieselgel HR reinst (Fa. Merck) werden in einem Schliff-Erlenmeyerkolben mit 50 ml H_2O versetzt und während 30 Min. stark geschüttelt. Dann wird der offene Kolben in einem Vakuum-exsiccator zur Entfernung der Luftbläschen kurz evakuiert. Das Gel wird dann mit einem Streichgerät auf 5 entfetteten Platten 20×20 cm in einer Schichtdicke von 0,25 mm ausgestrichen und an der Luft getrocknet. Unmittelbar vor Gebrauch werden die Platten während 90 Min. bei 110° aktiviert.

Auftragen der Proben

Pro Platte können bis zu acht Proben 15 mm oberhalb des unteren Randes strichförmig aufgetragen werden. Am günstigsten ist jedoch die Anordnung mit 6 Proben, je auf einer Länge von 1 cm aufgetragen, mit einem Abstand von 2 cm zwischen den Proben. Die Auftragstellen werden mit einer Nadel auf der Platte markiert, wonach mit einer Mikropipette von jedem Serum 2 Proben à 0,1 ml aufgetragen werden (je 2 Proben von 2 der ursprünglichen 3 Lipoidextrakte). Die Auftragung kann am besten tropfenweise (Tropfen à etwa 5 μl entlang der Auftraglinie) bewerkstelligt werden, wobei jeweils mit dem Gebläse getrocknet wird. Die Schicht soll bei der Auftragung nicht verletzt werden.

Chromatographie

Laufmittel: Chloroform-Methanol- H_2O (14 : 6 : 1) (11). Die mit Filterpapier ausgekleideten Kammern sollen mindestens 4 Stdn. mit dem Laufmittel (100 ml) zur Sättigung der Gasphase stehen gelassen werden. Die Platten werden sodann während 30–45 Min. chromatographiert, bis die Lösungsmittelfront eine Höhe von 16 cm erreicht hat. Die Platten werden dann sofort unter dem Gebläse getrocknet und anschließend in eine Kammer gebracht, in welcher kurz vorher einige Kristalle Jod in einem erhitzten Tiegel verdampft wurden. Nach etwa 15 Min. kann die Platte herausgenommen werden und die 4 unverkennbaren Flecken für (von oben nach unten) Kephalin, Lecithin, Sphingomyelin (Doppelinie) und Lysolecithin werden mit einer Nadel etwa 2 mm außerhalb der Farbgrünze des Jods punktförmig umrandet (Abb. 1). Sehr gute Trennungen erhält man auch mit einer von JATZKEWITZ (11) veröffentlichten 2-Stufentechnik. Die Platten werden dabei zuerst nach der oben aufgeführten Vorschrift chromatographiert, dann aber nur während 5 Min. an der Luft antrocknen gelassen und anschließend in einer zweiten Kammer mit n-Propanol/12,5-proz. NH_3 (4 : 1) bis zu einer Höhe von 10 cm erneut chromatographiert (Abb. 2).

Eluierung der Phospholipidfraktionen

Die auf der Platte angezeichneten Fraktionen werden einzeln mit dem Spatel auf ein Pergamentpapier abgekratzt, in ein Reagenzglas

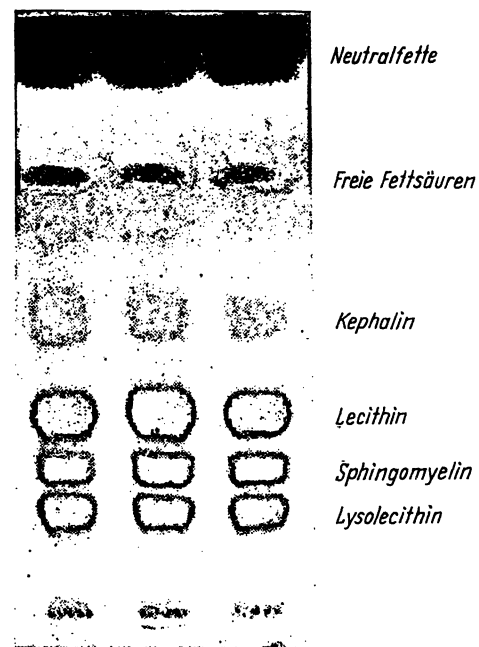


Abb. 1

Dünnschichtchromatogramm eines Lipoidextraktes aus Serum; Auftragsmenge: 1 mg

Schicht: Kieselgel HR reinst Merck; Solvens: Chloroform/Methanol/ H_2O 14:6:1; Laufstrecke 16 cm; Färbung: Joddämpfe

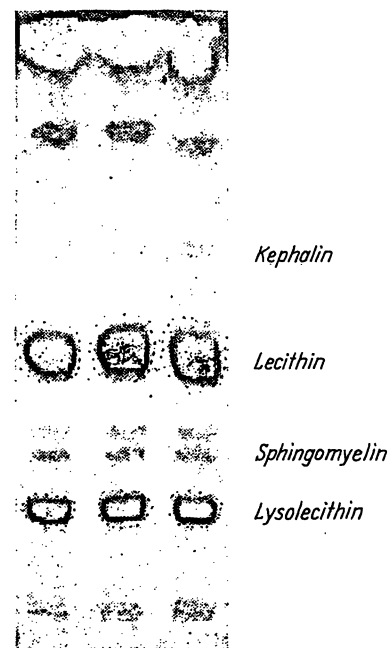


Abb. 2

Dünnschichtchromatogramm eines Lipoidextraktes aus Serum; Auftragsmenge: 1 mg

Schicht: Kieselgel HR reinst Merck; Solvens: a) Chloroform/Methanol/ H_2O 14:6:1; b) n-Propanol/12,5% NH_3 4:1; Laufstrecke: a) 16 cm b) 10 cm

gebracht und anschließend mit 5 ml folgender Lösungsmittelgemische versetzt: Kephalin: Chloroform-Methanol (2 : 1), Lecithin und Sphingomyelin: Chloroform-Methanol (1 : 1) und Lysolecithin: Methanol- H_2O (1 : 1). Die Röhrchen werden 15 Min. im Wasserbad bei 45° durch gelegentliches Rühren mit einem eingepaßten Glasstab extrahiert und anschließend 5 Min. bei etwa 1500 g zentrifugiert. Der erste Extrakt wird abgegossen und das Kieselgelsediment wird nochmals zweimal auf dieselbe Art extrahiert. Die gesammelten Extrakte werden sodann im Wasserbad bei 60° durch Einblasen von N_2 zur Trockene gebracht. Die anschließende P-Bestimmung kann in denselben Röhrchen durchgeführt werden.

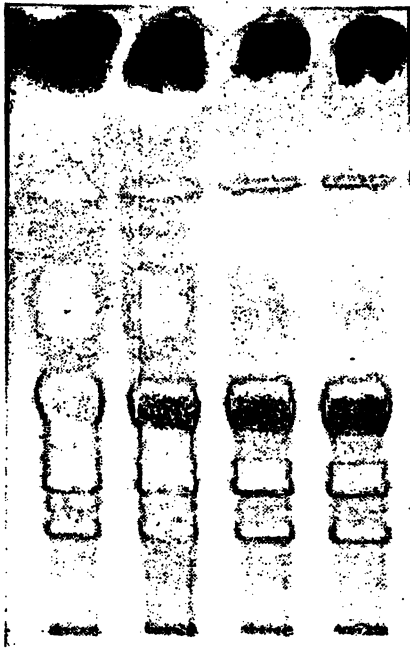


Abb. 3

Dünnschichtchromatogramm von 2 Lipoidextrakten aus demselben Serum wie Abbildung 2

Schicht: Kieselgel HR reinst Merck; Solvens a) Chloroform/Methanol/H₂O 14:6:1; b) n-Propanol/12,5% NH₃ 4:1; Färbung: Joddämpfe

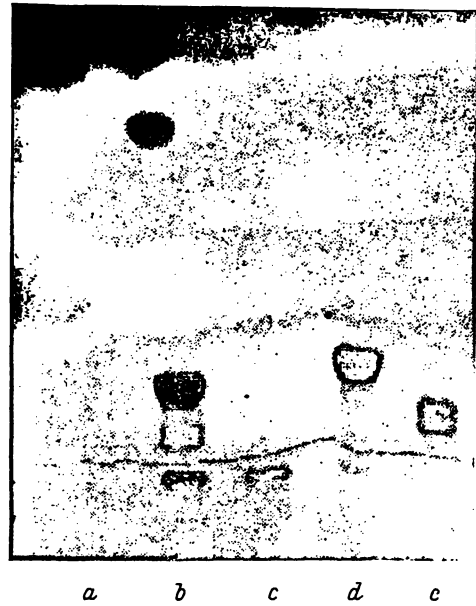


Abb. 4

Dünnschichtchromatogramm mit Jod gefärbt; Laufmittel nach JATZKEWITZ

- | | |
|------------------------------|------------------------|
| a) 5 µg Kephalin | d) 100 µg Lecithin |
| b) 600 µg Serumlipoidextrakt | e) 20 µg Sphingomyelin |
| c) 20 µg Lysolecithin | |

Phosphor-Bestimmung

Man verfährt genau gleich wie vorher beschrieben. Für die Berechnung legt man folgende Faktoren zugrunde: Kephalin, Lecithin, Sphingomyelin: 25 und Lysolecithin: 16,7. Der errechnete Wert ergibt die Menge der entsprechenden Phospholipoidfraktion pro 1 mg Gesamtlipoid (aufgetragene Menge).

Beispiel (Resultate s. Tab. 1—3)

Lipoidbestimmung in einem normalen menschlichen Serum

a) Lipoidextraktion von 3 Proben à 1 ml.

Je 4 ml/ der Chloroformphase eingetrocknet und gewogen: 4,70; 4,61 und 4,60 mg/4 ml, umgerechnet auf die Gesamtmenge des Chloroforms von 6 ml ergibt entsprechend: 7,05; 6,92 und 6,90 mg Gesamtlipoid/m/ Serum.

Mittelwert für Gesamtlipoid: 696 mg%

b) Phosphatide

Zu Röhrchen 2 und 3 werden je 0,46 ml/ Chloroform gegeben, wobei eine klare Lösung entsteht. 0,1 ml/ dieser Lösungen werden entnommen und auf 3,5 ml/ mit Chloroform ergänzt. Davon werden dreimal je 0,5 ml/ abpipettiert, eingetrocknet und zur P-Bestimmung gebracht (Tab. 1).

c) Chromatographie

Auftragmengen: 2mal je 0,1 ml/ Chromatogramm: Abbildung 3.

Ergebnisse

Extraktion der Lipide aus Serum oder Plasma DE IONGH und VAN PELT (18) haben kürzlich gezeigt, daß die von FOLCH und Mitarbeiter (19) für Gewebe ausgearbeitete Lipoid-Extraktion auch für Serum bessere Resultate zeigt, als die im allgemeinen übliche Extraktion nach BLOOR (20). RENKONEN und Mitarbeiter (21) haben nun diese Methode in Anlehnung an die Arbeitstechnik von BLIGH und DYER (22) modifiziert und ein außerordentlich einfaches Extraktionsverfahren ausgearbeitet, welches bezüglich Genauigkeit dem FOLCH'schen Verfahren kaum nachsteht, dafür aber eine wesentliche Vereinfachung und Verkürzung des Extrak-

tions-Vorganges darstellt. Wir haben in einer Reihe von Versuchen an einigen Sera die Methode von BLOOR (20), FOLCH und Mitarbeitern (19) und RENKONEN und Mitarbeitern (21) vergleichend durchgeführt und können bestätigen, daß die nach RENKONEN gefundenen Werte gut reproduzierbar sind und der FOLCH'schen Methode weitgehend entsprechende Resultate ergeben.

1 Normalserum und 2 hyperlipämische Sera wurden in je 10 Versuchen nach 3 Methoden extrahiert (BLOOR, FOLCH und RENKONEN) und anschließend gravimetrisch das Gesamtlipoid und mittels einer Phosphor-Bestimmung der Phosphatid-Anteil bestimmt.

Extraktion nach FOLCH

1 ml/ Serum wird in 19 ml/ Chloroform-Methanol (2:1) eingegeben und während 3 Min. stark geschüttelt. Man läßt 30 Min. stehen und filtriert die Ausfällung ab. Zu 10 ml/ der klaren Lösung gibt man 2 ml/ H₂O und schüttelt stark während 30 Sek. Die Emulsion wird bei 1500 g während 20 Min. zentrifugiert, wonach die obere Phase möglichst weitgehend abgesogen wird. Man gibt nochmals 2 ml/ „theoretische obere Phase“ zu (Chloroform-Methanol-H₂O (3:48:47)) schüttelt gut durch und zentrifugiert erneut, um die obere Schicht abzusaugen. Die Chloroformphase wird sodann unter N₂ bei 37° eingetrocknet und gewogen. Auflösen des Lipoides in Chloroform und Bestimmung des Phosphors im aliquotem Teil.

Extraktion nach BLOOR

1 ml/ Serum wird tropfenweise in 19 ml/ einer siedenden Mischung von Äthanol-Äther (3:1) gegeben und während 1 Min. unter Rühren weiter gekocht. Die Mischung wird durch ein Papierfilter filtriert und das Filter mit

Tab. 1
Resultat der Phosphatidbestimmung; Mittelwert für Gesamtphosphatide 197 mg% oder 28,4% Phosphatide vom Gesamtlipoid

Probe	Extinktion	Mittelwert	µg Phosphor pro Röhrchen	Gesamt	mg Gesamt-Phosphatide	% Phosphatide vom Gesamtlipoid
Standard (2 µgP)	0,362 0,365 0,364	0,3637	—	—	—	—
Probe 2	0,297 0,301 0,302	0,300	1,645	79,5 ¹⁾	1,987	28,7
Probe 3	0,301 0,299 0,297	0,299	1,650	77,9 ²⁾	1,945	28,2

$$1) \text{ Umrechnungsfaktor } f = \frac{3,5}{0,5} \cdot \frac{0,46}{0,1} \cdot \frac{6,92}{4,61} = 48,336$$

$$2) \text{ Umrechnungsfaktor } f = \frac{3,5}{0,5} \cdot \frac{0,46}{0,1} \cdot \frac{6,90}{4,60} = 48,300$$

Tab. 2
Resultate der Phosphor-Bestimmung der Fraktionen

Fraktion	Extinktion ¹⁾	Mittelwert	µg Phosphor pro Röhrchen	Gesamt ²⁾	Gesamt- Phosphatid in mg ³⁾	% Phosphatid vom Gesamt- Phosphatid ⁴⁾
Standard (2 µgP)	0,361 0,365 0,364	0,3633				
Kephalin						
Probe 2a	0,026	0,0395	0,218	1,50	37,5	1,89
2b	0,053					
3a	0,039					
3b	0,056	0,0475	0,262	1,81	45,2	2,32
Lecithin ⁵⁾						
Probe 2a	0,618	0,612	3,37	46,4	1160	58,4
2b	0,606					
3a	0,605					
3b	0,591	0,598	3,30	45,6	1140	58,7
Sphingomyelin						
Probe 2a	0,355	0,352	1,94	13,4	335	16,9
2b	0,349					
3a	0,358					
3b	0,384	0,371	2,04	14,1	353	18,2
Lysolecithin						
Probe 2a	0,281	0,300	1,65	11,4	190	9,57
2b	0,319					
3a	0,280					
3b	0,272	0,276	1,52	10,4	173	8,90

¹⁾ Der Reagenzienblindwert ergibt sich durch Auskratzen einer ungefähr der Größe der Fraktionen entsprechenden Region Kieselgel in einem Gebiet, das keine Färbung mit Jod aufweist.

²⁾ Der Gesamtphosphor errechnet sich nach der aliquoten Auftragsmenge: $F = \frac{0,46}{0,1} \cdot \frac{6}{4} = 6,9$.

³⁾ Umrechnungsfaktoren betragen für Kephalin, Lecithin und Sphingomyelin 25, für Lysolecithin 16,7.

⁴⁾ Bei den Proben 2 rechnet man die %-Werte auf die Gesamtphosphatidmenge von 1,987 mg, bei den Proben 3 auf 1,945 mg.

⁵⁾ Vor der Veraschung wurden die Proben durch erneutes Aufnehmen in 1,0 ml Chloroform und Abpipettieren von 0,5 ml auf die Hälfte reduziert, da sonst die Extinktionen den Wert von 1,0 übersteigen.

Tab. 3
Endresultat der Lipoidzusammensetzung

Gesamtlipoide	696 mg%	Variationskoeffizient ¹⁾
Anteil Phosphatide	28,4%	± 1,2%
Phosphatide in % vom Gesamt-Phosphatid		
Kephalin	2,1	± 34%
Lecithin	58,6	± 2,4%
Sphingomyelin	17,5	± 4,6%
Lysolecithin	9,2	± 9,9%
Restliche nicht bestimmte Phosphatide (Differenz zu 100%)	12,6	

¹⁾ Dieser Wert $\left(\frac{S \cdot 100}{\bar{x}} \right)$ ergab sich aus den statistischen Berechnungen, (s. Abb. 6—11).

insgesamt 8 ml/ des heißen Lösungsmittels nachgewaschen. Der Extrakt wird unter Vakuum bei 60° zur Trockene eingedampft, in etwa 2—3 ml/ Chloroform gelöst, erneut filtriert, und das Filter mit etwa 2—3 ml/ Chloroform nachgewaschen. Die Lösung wird unter N₂ bei 40° zur Trockene gebracht und gewogen. Phosphor-Bestimmung im aliquoten Teil einer Chloroformlösung des getrockneten Gesamtlipoides.

Extraktion nach RENKONEN

Analog der unter „Methodik“ beschriebenen Lipoidextraktion.

Resultate

Die nach den 3 Methoden durchgeführten Bestimmungen (s. Tab. 4) bestätigten, daß die RENKONEN-Technik trotz ihrer Einfachheit Werte liefert, welche den nach FOLCH erhaltenen Resultaten sehr angenähert sind. Auch die Streuung der Resultate ist bei beiden Methoden im gleichen Rahmen. Entgegen den Resultaten vergleichender Untersuchungen von JESTING und BANG (23) erhielten wir mit der BLOOR-Technik durchweg höhere Werte als mit den beiden anderen Methoden. Sowohl der Gesamtlipoidgehalt wie der Phosphorgehalt liegen bei der BLOOR-Technik etwa 11—19% höher, was wir auf das Fehlen eines Auswaschprozesses bei dieser Methode und damit auf die Mitbestimmung von Nicht-Lipoiden zurückführen möchten. Für Routine-Lipoidextraktionen aus Serumproben kann somit die RENKONEN-Technik ohne weiteres empfohlen werden.

Tab. 4
Vergleich der Lipoidextraktionsmethoden nach RENKONEN, FOLCH und BLOOR

Serumprobe	Methode RENKONEN Gesamtlipoid mg %	Phosphatide %	Methode FOLCH Gesamtlipoid mg %	Phosphatide %	Methode BLOOR Gesamtlipoid mg %	Phosphatide %
Nr. 16	681	30,2	661	28,6	740	32,1
	686	30,1	671	27,8	716	29,9
	697	31,0	688	29,1	784	30,5
	720	29,8	662	29,6	750	31,4
	684	30,1	670	28,4	776	32,0
	664	30,5	656	27,9	725	30,1
	701	30,9	680	28,0	738	31,3
	675	31,0	682	29,5	762	32,4
	699	30,3	679	29,4	780	31,1
	693	31,1	669	28,6	781	31,5
Mittelwert	690	30,5	672	28,7	755	31,2
Standardabweichung	15,61	0,446	10,32	0,679	24,9	0,845
Variationskoeffizient in %	± 2,3%	± 1,5%	± 1,5%	± 2,3%	± 2,3%	± 2,7%
Nr. 45	1201	18,1	1227	17,7	1372	18,4
	1181	18,5	1173	17,2	1410	17,9
	1223	17,9	1162	18,2	1352	17,9
	1169	18,1	1205	18,2	1467	19,1
	1205	18,9	1215	18,4	1422	19,4
	1241	18,2	1190	17,8	1488	18,3
	1215	18,3	1154	17,3	1405	17,6
	1251	17,6	1175	17,4	1436	18,0
	1237	18,7	1210	17,9	1428	19,3
	1181	17,8	1207	17,8	1416	19,0
Mittelwert	1210	18,2	1192	17,8	1420	18,5
Standardabweichung	27,9	0,405	24,6	0,404	40,8	0,657
Variationskoeffizient in %	± 2,3%	± 2,2%	± 2,1%	± 2,2%	± 2,8%	± 3,5%
Nr. 91	5850	6,51	6210	6,34	7310	7,28
	6200	6,33	6020	6,11	7250	7,62
	6090	6,36	5960	6,21	7455	7,51
	6070	6,50	6260	6,06	7080	7,84
	5980	6,45	6070	6,40	7120	7,31
	5980	6,40	6100	6,44	7020	7,26
	6030	6,39	5910	6,22	7240	7,66
	5920	6,48	5990	6,24	7410	7,43
	5940	6,34	6130	6,16	7280	7,84
	6130	6,53	6160	6,32	7230	7,28
Mittelwert	6020	6,43	6080	6,25	7240	7,50
Standardabweichung	105,7	0,0724	112,4	0,1238	137,5	0,228
Variationskoeffizient in %	± 1,7%	± 1,12%	± 1,8%	± 1,9%	± 1,9%	± 3,0%

Phosphor-Bestimmung

Für die quantitative Erfassung besonders der nur in geringen Mengen vorliegenden Kephalinfraktion muß von einer Mikromethode zur Phosphorbestimmung eine Mindestempfindlichkeit von $0,1 \mu\text{g P}$ pro Probe verlangt werden. Wir hofften, dieses Ziel unter Verwendung einer Methode zu erreichen, bei der die Veraschung der Probe bei Anwesenheit des Kieselgels erfolgt; das Trägermaterial wird bei dieser Methodik erst unmittelbar vor dem Photometrieren des entwickelten Farbstoffs abgetrennt. Wir folgten dabei Vorschriften von DOIZAKI und ZIEVE (9), welche nach BARTLETT (24) arbeiten, sowie von ROBINSON und PHILLIPS (12), welche eine Modifikation der BARTLETT-Technik angeben. Bei beiden Methoden, wie auch bei einer äußerst empfindlichen Modifikation der BARTLETT-Technik, welche SHIN (25) beschrieben hat, wurde aber eine eindeutige Störung der Resultate durch das Kieselgel HR beobachtet. CHRISTIAN und Mitarbeiter (8) fanden nach der Methode von DOIZAKI und ZIEVE (9) Blindwerte für Kieselgel allein von 0,050 Extinktion pro mg Kieselgel, was wir größenordnungsmäßig bestätigen können. Die Streuung dieser Werte war jedoch bei uns sehr groß und führte speziell bei den Kephalinwerten zu Fehlerbreiten von mehr als $\pm 100\%$.

Wir verließen deshalb diese mit vielen Schwierigkeiten verbundene direkte Veraschung des Kieselgels und wandten uns der Extraktion der Phospholipoidfraktionen aus dem ausgekratzten Kieselgel zu. Die ersten Versuche

wurden mit reinen Phospholipoidfraktionen¹⁾ durchgeführt, welche wir auf einer Platte wie in der Vorschrift unter „Methodik“ angegeben, verarbeiteten. Als Extraktionslösung verwendeten wir verschiedene Gemische von Chloroform und Methanol, wobei das ausgekratzte Kieselgel jeweils dreimal mit 5 ml des Lösungsmittels wie unter „Methodik“ angegeben, extrahiert wurde. Die höchsten Extraktionsausbeuten erhielten wir dabei mit folgenden Mischungen:

Kephalin: Chloroform-Methanol (2:1)
Lecithin: Chloroform-Methanol (1:1)
Sphingomyelin: Chloroform-Methanol (1:1)
Lysolecithin: Methanol- H_2O (1:1)

Ein Kontrollversuch mit einem Serumlipoidextrakt, welchem ein Gemisch der reinen Testphosphatide mit bekanntem Gehalt beigelegt wurde, ergab folgendes Resultat (s. Tab. 5):

Serumlipoid in Chloroform: P-Gehalt $125 \mu\text{g P/ml}$
Auftragmenge: $50 \mu\text{l}$ ($6,25 \mu\text{g P}$)
Testgemisch in Chloroform: P-Gehalt $105 \mu\text{g P/ml}$
Kephalin $10 \mu\text{g P/ml}$, Lecithin $50 \mu\text{g P/ml}$
Sphingomyelin $30 \mu\text{g P/ml}$, Lysolecithin $15 \mu\text{g P/ml}$
Auftragmenge $30 \mu\text{l}$ Testgemisch zusätzlich zu $50 \mu\text{l}$ Serumlipoidextrakt.

¹⁾ Lecithin und Kephalin der Fa. Sigma wurden chromatographisch an einer Kieselsäure-Kolonne gereinigt. Sphingomyelin verdanken wir Herrn Prof. KLENK, Köln. Lysolecithin erhielten wir durch Einwirkung von Pankreas-Phospholipase A auf Lecithin und nachträgliche chromatographische Reinigung.

Tab. 5
Ausbeuteversuch nach Zusatz eines Testgemisches von reinen Phosphatiden;
gefundene Phosphorwerte nach Chromatographie und Extraktion des Kieselgels

	Serumlipoid µg P gefunden	Serumlipoid + Testgemisch µg P gefunden	µg P Differenz	Theoretisch	Ausbeute (%)
Kephalin	0,13 0,14 0,13	0,42 0,40 0,40	0,28	0,30	93
Lecithin	3,65 3,71 3,62	5,18 5,10 5,17	1,49	1,50	99
Sphingomyelin	1,26 1,21 1,25	2,10 2,02 2,08	0,83	0,90	92
Lysolecithin	0,56 0,60 0,55	0,97 0,99 0,96	0,40	0,45	89
Total	5,60 = 90%		3,00	3,15	95

Der Versuch zeigt, daß im Rahmen der Fehlerbreite der Methodik die zugegebenen Phosphatide nach der Extraktion meist zu mehr als 90% wiedergefunden werden. Die Ausbeute von 90% bei den Serumlipoiden allein beruht zum Teil darauf, daß einige weitere allerdings nur in geringfügiger Menge vorkommende Phosphatide wie z. B. Phosphatidsäure, Cardiolipin und Inositphosphatide gar nicht zur Bestimmung gelangen. Für die P-Bestimmung in den aus dem Kieselgel extrahierten Phosphatid-Fractionen verwendeten wir eine Modifikation der einerseits von BARTLETT (24) und andererseits von SHIN (25) beschriebenen „Heating-method“. Im Gegensatz zur ursprünglichen FISK-SUBBAROW (17)-Methode erhitzen diese Autoren das Reaktionsgemisch unmittelbar nach Zusatz des Reduktions-Reagenzes während 7 Min. bei 106° und erzielen dabei eine etwa 20fache Erhöhung der Extinktion. Unsere Modifikation folgt weitgehend den Bedingungen von BARTLETT (24) mit Ausnahme der Aufschlußbedingungen. Durch Erhöhung des Schwefelsäurezusatzes von 0,5 ml/ auf 0,75 ml/ pro Röhrchen bei der Veraschung konnten wir verhindern, daß bei der Veraschung höherer Lipoidmengen eine Farbabschwächung wegen zu niedriger H₂SO₄-Konzentration eintrat. (Ohne Einbuße der Farbausbeute wegen zu hoher Säuremenge könnten der Probe bis zu 0,85 ml/ H₂SO₄ zugefügt werden). Im weiteren haben wir anstelle einer total 4½stündigen Aufschlußzeit bei 150–160°, wie dies BARTLETT vorschreibt, vorgezogen, jede Probe auf dem Bunsenbrenner aufzuschließen, wobei pro Stunde etwa 15 bis 20 Röhrchen bearbeitet werden können.

Identifizierung

Bei Anwendung der unter „Methodik“ aufgeführten Bedingungen für die Dünnschichtchromatographie ist es ohne weiteres möglich, die Banden eindeutig zuzuordnen. Wir haben mit Hilfe von Testsubstanzen die Identifizierung durchgeführt und konnten dabei feststellen, daß bei der Färbung mit Jod eine falsche Zuordnung der Fraktionen kaum möglich ist. Einige Schwierigkeiten kann allerdings das Kephalin bereiten, indem wohl die Bande eindeutig feststellbar ist, jedoch die Grenzen der Fraktion nicht immer leicht zu erkennen

sind. Da die beiden Kephaline Phosphatidylserin und Phosphatidyl-aethanolamin vielfach nicht gleich hoch ansteigen, ist es angezeigt, den für die quantitative Bestimmung auszukratzenden Bereich genügend groß zu wählen.

Statistische Versuche zur Ermittlung der Fehlerbreite

Ein und dasselbe Serum wurde fünfmal nach der unter „Methodik“ angegebenen Vorschrift aufgearbeitet, wobei die Bestimmungen je im Abstand von 2 Tagen durchgeführt wurden. In Abänderung der angegebenen Methode wurden jedoch alle 3 Lipoidextrakte je einmal chromatographiert, einer davon auf einer separaten Platte am nächstfolgenden Tag (Resultate s. Tab. 6–11).

Tab. 6
Gesamtlipoidbestimmungen

Versuch Nr.	mg Gesamt- lipoid/ml Serum	Mittel- wert	Standard- Abweichung	Variations- koeffizient %
1 a	7,05			
b	6,92	6,96	0,0816	± 1,17
c	6,90			
2 a	6,98			
b	6,90	6,95	0,0463	± 0,67
c	6,98			
3 a	7,07			
b	7,01	7,00	0,0704	± 1,1
c	6,93			
4 a	6,97			
b	6,89	6,94	0,0495	± 0,71
c	6,98			
5 a	7,03			
b	7,01	6,98	0,0644	± 0,92
c	6,91			

Tab. 7
Phosphatidbestimmungen
Werte in % Phosphatide vom Gesamtlipoid;
Mittelwert aus je 3 Werten

Versuch Nr.	
1 a	28,7
b	28,2
c	28,3
2 a	27,9
b	28,5
c	28,4
3 a	28,1
b	28,8
c	28,2
4 a	29,0
b	28,1
c	28,6
5 a	28,5
b	28,0
c	28,1

Tab. 8
Bestimmung von Kephalin

Versuch Nr.	% Kephalin vom Gesamtphosphatid	Mittelwert	Standardabweichung	Variations-Koeffizient in %
1 a	1,89	2,08	± 0,22	± 10
b	2,32			
c	2,02			
2 a	3,65	2,68	± 0,84	± 31
b	2,12			
c	2,27			
3 a	1,53	2,12	—	—
b	2,72			
c	—			
4 a	2,41	2,89	± 0,97	± 34
b	4,01			
c	2,25			
5 a	2,55	2,13	± 0,40	± 19
b	2,10			
c	1,75			

Tab. 10
Bestimmung von Sphingomyelin

Versuch Nr.	% Sphingomyelin vom Gesamtphosphatid	Mittelwert	Standardabweichung	Variations-Koeffizient in %
1 a	16,9	17,4	± 0,70	± 4,0
b	18,2			
c	17,1			
2 a	17,2	17,8	± 0,49	± 2,7
b	18,0			
c	18,1			
3 a	17,4	17,5	± 0,70	± 4,0
b	16,8			
c	18,2			
4 a	18,0	17,6	± 0,32	± 1,8
b	17,5			
c	17,4			
5 a	16,7	17,4	± 0,81	± 4,6
b	17,3			
c	18,3			

Tab. 9
Bestimmung von Lecithin

Versuch Nr.	% Lecithin vom Gesamtphosphatid	Mittelwert	Standardabweichung	Variations-Koeffizient in %
1 a	58,4	59,7	± 1,20	± 2,0
b	58,7			
c	60,1			
2 a	59,2	58,9	± 1,32	± 2,2
b	57,5			
c	60,1			
3 a	58,4	58,2	± 0,88	± 1,5
b	58,9			
c	57,2			
4 a	60,7	59,2	± 1,40	± 2,4
b	59,1			
c	57,9			
5 a	58,5	59,3	± 0,75	± 1,3
b	59,4			
c	60,0			

Tab. 11
Bestimmung von Lysolecithin

Versuch Nr.	% Lysolecithin vom Gesamtphosphatid	Mittelwert	Standardabweichung	Variations-Koeffizient in %
1 a	9,57	9,01	± 0,52	± 5,8
b	8,90			
c	8,55			
2 a	10,30	9,30	± 0,90	± 9,7
b	8,65			
c	9,05			
3 a	9,60	9,03	± 0,63	± 7,0
b	9,15			
c	8,35			
4 a	8,95	9,45	± 0,59	± 6,2
b	10,10			
c	9,30			
5 a	8,25	9,30	± 0,92	± 9,9
b	9,70			
c	9,95			

Diskussion

Unsere vergleichenden Versuche über die Extraktion der Lipide aus dem Serum bestätigen eine Reihe von Arbeiten (21, 22, 26), aus denen hervorgeht, daß auch bei starker Reduktion des Extraktionsvolumens die Ausbeute an extrahiertem Lipoid gegenüber der ursprünglichen FOLCH-Technik *nicht* geringer wird. Die Verbesserung der Lipoidextraktion durch die von FOLCH und Mitarbeitern (19) eingeführten Chloroform-Methanol-Mischungen gegenüber der BLOOR-Variante mit Äthanol-Äther kam auch bei unserer Versuchsanordnung deutlich zum Ausdruck.

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der extrahierten Serumlipide bietet heute kaum mehr Schwierigkeiten, bestehen doch eine ganze Reihe von sehr guten Vorschriften (6, 27, 13, 15, 7, 12). Die besten Resultate erhielten wir im Hinblick auf die saubere Trennung der Phosphatide mit der von JATZKEWITZ (11) vorgeschlagenen 2-Stufen-Technik, nämlich Chloroform-Methanol-H₂O (14:6:1) und Propanol-12,5proz. Ammoniak (4:1).

Bei der Identifizierung und speziell der Abgrenzung der Kephalinfraktion können gewisse Schwierigkeiten auftreten, einerseits wegen der sehr geringen Menge dieses Phosphatides, andererseits wegen der nicht sehr gut reproduzierbaren R_F -Werte des Serin-Kephalins und Äthanolamin-Kephalins. Erschwerend wirkt sich zudem aus, daß eine Sichtbarmachung mit Ninhydrinreagenz nicht durchgeführt werden kann, weil dann die anschließende Extraktion aus dem Kieselgel nicht mehr quantitativ verläuft. Wie weiter unten bei der Diskussion der Genauigkeit unserer Methode noch ausgeführt wird,

ist die Bestimmung des Kephals mit der hier vorgeschlagenen Technik deshalb nicht sehr befriedigend, und falls die möglichst genaue Bestimmung dieses Phosphatides im Vordergrund steht, müßte eine andere Methode gewählt werden.

Wie die Ausbeutenberechnung (s. Tab. 3) verdeutlicht, findet man nach der Chromatographie nur etwa 85 bis 90% der aufgetragenen Phosphatide wieder. Die restlichen 10–15% verteilen sich größtenteils auf die nur in geringen Mengen vorkommenden anderen Phosphatide. Diese finden sich zum Teil nicht identifizierbar außerhalb, zum Teil aber auch innerhalb der ausgekratzten Zonen (Cardiolipin, Phosphatidsäure, Inosit-Phosphatide, Lysokephalin, Plasmalogene). Dieser Umstand hat eine geringfügige Verfälschung der mit unserer Methode für Kephalin, Lecithin, Sphingomyelin und Lysolecithin bestimmten Werte zur Folge, doch dürfte dieser Fehler, ausgenommen beim Kephalin, kaum merklich ins Gewicht fallen. Geringe Mengen Phosphatid gehen zudem bei der Extraktion aus dem Kieselgel verloren (s. Tab. 5). Die Extraktion der Phosphatide aus dem Kieselgel für die P-Bestimmung ist unseres Erachtens trotz der etwas komplizierteren Technik vorteilhafter als die direkte Veraschung zusammen mit dem Trägermaterial. Die starke Streuung der Blindwerte für Kieselgel allein bringt einen zusätzlichen Fehler und die von ZIEVE und Mitarbeitern (15) und von PHILLIPS (12) sowie von CHRISTIAN (8) angegebenen P-Bestimmungs-Techniken ergaben in unseren Versuchen durchweg zu niedrige Werte. PHILLIPS weist in seiner Arbeit auf den inhibierenden Effekt des Kieselgels bei der Farbbildung hin; er korrigiert denn auch alle gefundenen

P-Werte um 20% nach oben, dies basierend auf Experimente, in denen der Inhibitoreffekt verschieden großer Mengen Kieselgel bestimmt und, ausgedrückt als Farbverminderung, zu 11%—27% gefunden wurde. Die aufgrund der statistischen Berechnungen gefundene Genauigkeit der Methode darf für die Werte der Gesamtlipoide, der Phosphatide, des Lecithins und Sphingomyelins als befriedigend bezeichnet werden. Beim Lysolecithin mit einem Variationskoeffizienten von $\pm 10\%$ wäre eine größere Genauigkeit sehr wünschenswert, hauptsächlich im Hinblick auf seine eventuelle Wichtig-

keit bei der Komplement-Lyse. Sehr fragwürdig bleibt wie bereits erwähnt die Bestimmung des Kephaling (Variationskoeffizient $\pm 34\%$). Die Fehlerbreite bei der von uns vorgeschlagenen Methode ist allerdings immer noch wesentlich geringer als die Variabilität der Lipidzusammensetzung bei normalen Sera. Tatsächlich scheint heute das Problem der Feststellung signifikanter Abweichungen vom Norm-Wert weit eher durch statistisch einwandfreie Festlegung der Normalverteilung der Gesamtlipoide, als durch die Genauigkeit der analytischen Prozeduren bestimmt zu sein.

Literatur

1. KAUFMANN, H. P., *Fette und Seifen* 46, 268 (1939). — 2. WREN, J. J., *J. Chromatogr.* 4, 173—195 (1960). — 3. MARINETTI, G. V., *J. Lipid Res.* 3, 1 (1962). — 4. WEICKER, H., *Klin. Wochenschr.* Jg. 37, Heft 14, 763 (1959). — 5. MANGOLD, H. K., *Fette, Seifen und Anstrichmittel* 61, 877 (1959). — 6. WAGNER, H., L. HÖRHAMMER und P. WOLFF, *Biochem. Zeitschr.* 334, 175—184 (1961). — 7. BLANK, M. L., J. A. SCHMIT und O. S. PRIVETT, *J. Am. Oilchemists Soc.* 41, Nr. 5, 371 (1964). — 8. CHRISTIAN, J. C., S. JAKOVIC und D. YI-YUNG HSIA, *J. Lab. Clin. Med.* 5, 5 (1964). — 9. DOIZAKI, W. M. und L. ZIEVE, *Proc. Exp. Biol. Med.* 113, 91 (1963). — 10. HABERMANN, E. G., G. BANDFLOW und B. KRUSCHE, *Klin. Wschr.* 39, 816 (1961). — 11. JATZKEWITZ, H., a) *Hoppe Seyler's Zeitschr. physiol. Chemie* 326, 61 (1961), b) *Hoppe Seyler's Zeitschr. physiol. Chemie* 336, 25 (1964). — 12. ROBINSON, N. und B. M. PHILLIPS, *Clin. Chim. Acta* 8, 385 (1963). — 13. SKIPSKI, V. P., R. F. PETERSON, J. SANDERS und M. BARCLAY, *J. Lipid Res.* 4, No. 2, 227 (1963). — 14. VIKROT, O.,

Acta Med. Scand. 175, Fasc. 4, 443 (1964). — 15. VOGEL, W. C., W. M. DOIZAKI und L. ZIEVE, *J. Lipid Res.* 3, 138 (1962). — 16. ZÖLLNER, N. und G. WOLFRAM, *Klin. Wochenschr.* Jg. 40, Heft 21, 1101 (1962). — 17. FISK, C. H. und Y. SUBBA-ROW, *J. Biol. Chem.* 66, 375 (1925). — 18. DE IONGH, VAN PELT, J. G., *J. Lipid Res.* 3, No. 3, 385 (1962). — 19. FOLCH, J., M. LEES und G. H. SLOANE STANLEY, *J. Biol. Chem.* 226, 497 (1957). — 20. BLOOR, W. R., *J. Biol. Chem.* 77, 53 (1928). — 21. RENKONEN, O., T. U. KOSUNEN und O. V. RENKONEN, *Ann. Med. Exp. Biol. Fannia* 41, 375 (1963). — 22. BLIGH, E. G. und W. J. DYER, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 8 (1959). — 23. JESTING, E. und H. O. BANG, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 15, 654 (1963). — 24. BARTLETT, G. R., *J. Biol. Chem.* 234, 466 (1959). — 25. SHIN, Y. S., *Anal. Chem.* 34, 1164 (1962). — 26. HANSON, S. W. F. und J. OLLEY, *Biochem. J.* 89, 101p (1963). — 27. PRIVETT, O. S., M. L. BLANK, D. W. CODDING und E. C. NICKELL, *J. Am. Oil Chemist Soc.* 42, Nr. 5, 381 (1965).

Dr. P. Zahler, CH 3000 Bern, Freie Str. 1

Untersuchungen zur enzymatischen Bestimmung der Galaktose mit Galaktoseoxydase

Von H. FÖRSTER und M. HASLBECK

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt (Direktor: Prof. Dr. med. E. Heinz) und der III. Medizinischen Klinik des Krankenhauses München-Schwabing (Chefarzt: Priv. Doz. Dr. med. H. Mehnert)

(Eingegangen am 3. Januar 1967)

Die quantitative Galaktosebestimmung mittels Galaktoseoxydase-Peroxydase wurde untersucht. Dabei wurde als optimales Puffersystem Barbitalnatrium-Natriumacetat-Puffer gefunden. — Als Wasserstoffdonator wirkte o-Tolidin am günstigsten. Bestimmungen im Serum und besonders im Harn werden durch Harnsäure gestört. Dabei dienen Harnsäure und auch Glutathion als Wasserstoffdonatoren für die Peroxydasereaktion. Diese beiden Substanzen lassen sich jedoch auf einfache Weise durch Zusatz von Quecksilberacetat zu der als Enteiweißungsmittel dienenden Perchlorsäure eliminieren. Ein weiterer Vorteil des Quecksilberacetatzusatzes ist die dadurch bewirkte Farbvertiefung des Chromogens.

The quantitative determination of galactose by means of the coupled galactose-oxidase peroxidase system was investigated. Sodium barbiturate-sodium acetate buffer was found to be the most suitable system for this work. O-tolidine was the most satisfactory hydrogen-donor. Measurements in serum and particularly in urine were disturbed by the presence of uric acid. This is because uric acid and also glutathione may act as hydrogen donors for the peroxidase reaction. These two substances may be simply eliminated by the addition of mercuric acetate to the perchloric acid used as a protein precipitant. A further advantage of mercuric acetate is that it intensifies the colour of the chromogen.

Die Bestimmung der Galaktose im Blut war bisher immer schwierig, da eine spezifische Methode fehlte. Die im Blut vorhandene Glucose stört bei jedem chemischen Nachweis, der auf dem Reduktionsprinzip oder auf dem Furfurolprinzip beruht (1); denn die Blutglucosekonzentration ist meist wesentlich höher als die Blutgalaktosekonzentration, während die chemischen Nachweismethoden für beide Zucker etwa gleich empfindlich sind. Die Reduktionsmethoden erfassen zudem noch andere reduzierende Substanzen als sog. Restreduktion, wäh-

rend die o-Toluidin-Methode relativ spezifisch für Hexosen ist. Eine gewisse Verbesserung brachte die von WATSON (2) angegebene Methode. Glucose wird durch Glucoseoxydase zerstört und die von diesem Ferment nicht angegriffene Galaktose wird anschließend mit o-Toluidin bestimmt. Da aber die Glucoseoxydation mit Glucoseoxydase meist unvollständig ist, sind die Fehlermöglichkeiten dieser Methode immer noch groß (3). Neue Möglichkeiten ergaben sich aus der Isolierung der Galaktoseoxydase aus *Dactylium dendroides* (4—8). Die